

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-116750

(P2001-116750A)

(43)公開日 平成13年4月27日 (2001.4.27)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコ-ト <sup>*</sup> (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	M 2 G 0 4 2
C 0 7 K 1/04		C 0 7 K 1/04	2 G 0 5 8
C 1 2 N 15/09		C 1 2 Q 1/00	C 4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/00		1/68	A 4 B 0 2 9
1/68		G 0 1 N 1/00	1 0 1 K 4 B 0 6 3

審査請求 未請求 請求項の数15 O L (全 7 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平11-299803

(22)出願日 平成11年10月21日 (1999.10.21)

(71)出願人 000004064

日本碍子株式会社

愛知県名古屋市瑞穂区須田町2番56号

(72)発明者 山田 佐一

愛知県名古屋市瑞穂区須田町2番56号 日  
本碍子株式会社内

(72)発明者 川瀬 三雄

愛知県名古屋市瑞穂区須田町2番56号 日  
本碍子株式会社内

(74)代理人 100088616

弁理士 渡邊 一平

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 反応性チップの製造方法、同方法により製造されうる反応性チップ、および反応性物質

(57)【要約】

【課題】 プローブの合成や、あるいは、プローブの基板への登載にフォトリソグラフィー設備を必要とせず、また、高価で、加えて、極めて限定的な量しか入手できない貴重なDNA断片等の試料をプローブとして使用して、迅速で、確実に、かつ極めて微量を使用することにより、経済的に作製できるDNA断片等の反応性物質を高集積度で集積した反応性チップを製造する方法、同方法により製造されうる反応性チップ、およびDNA断片等の反応性物質を迅速、かつ経済的に合成する方法、同方法により製造されうる反応性物質の提供。

【解決手段】 所定の数のスポットを形成した基板上の所定のスポットに、所定量のDNA断片等の反応性物質を高速で、ジェットノズルを使用して、登載することにより、反応性物質をその表面に高集積度で集積した反応性チップを製造すること、および同方法を利用することにより、少量ではあるが数千を超える種類のペプチド等の反応性物質を一度に、迅速、かつ経済的に合成することにより達成。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 反応性物質と反応する基板を用意し、同基板上の所望の位置に所定量の反応性物質を含む溶液を1スポット当たり5ピコリッター以上の量で少なくとも毎秒5個の割合で、少なくとも10個の吐出孔を有するノズルから吐出させることによって、所望とする反応性物質を基板に固定することからなる反応性チップの製造方法。

【請求項2】 基板がガラスもしくはシリコン製であり、その表面は親和性付与の為に表面処理されているものである請求項1に記載の反応性チップの製造方法。

【請求項3】 反応性物質が、DNA断片、cDNA、RNA、酵素、抗原、抗体、エピトープ、タンパク質、ポリヌクレオチド、ペプチドからなる群から選ばれた少なくとも1種である請求項1に記載の反応性チップの製造方法。

【請求項4】 基板が、1cm<sup>2</sup>当たり少なくとも10,000個のスポットを有するものである請求項1に記載の反応性チップの製造方法。

【請求項5】 請求項1～4の何れか1項に記載の方法により製造されうる反応性チップ。

【請求項6】 反応性物質原料と反応する基板を用意し、同基板上の所望の位置に所定量の反応性物質原料を含む溶液を1スポット当たり5ピコリッター以上の量で少なくとも毎秒5個の割合で、少なくとも10個の吐出孔を有するノズルから吐出させることによって、所望とする反応性物質を基板上で合成し固定することからなる反応性チップの製造方法。

【請求項7】 基板がガラスもしくはシリコン製であり、その表面は親和性付与の為に表面処理されているものである請求項6に記載の反応性チップの製造方法。

【請求項8】 反応性物質が、ポリヌクレオチド、ペプチドからなる群から選ばれた少なくとも1種である請求項6に記載の反応性チップの製造方法。

【請求項9】 基板が、1cm<sup>2</sup>当たり少なくとも10,000個のスポットを有するものである請求項6に記載の反応性チップの製造方法。

【請求項10】 請求項6～9の何れか1項に記載の方法により製造されうる反応性チップ。

【請求項11】 反応性物質原料と反応する基板を用意し、同基板上の所望の位置に所定量の反応性物質原料を含む溶液を1スポット当たり5ピコリッター以上の量で少なくとも毎秒5個の割合で、少なくとも10個の吐出孔を有するノズルから吐出させることによって、所望とする反応性物質を基板上で合成し、次いで合成した反応物質を基板から分離することからなる反応性物質の製造方法。

【請求項12】 基板がガラスもしくはシリコン製であり、その表面は親和性付与の為に表面処理されているものである請求項11に記載の反応性物質の製造方法。

【請求項13】 反応性物質が、ポリヌクレオチド、ペプチドからなる群から選ばれた少なくとも1種である請求項11に記載の反応性物質の製造方法。

【請求項14】 基板が、1cm<sup>2</sup>当たり少なくとも10,000個のスポットを有するものである請求項11に記載の反応性物質の製造方法。

【請求項15】 請求項11～14の何れか1項に記載の方法により製造されうる反応性物質。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、DNAの機能解析や遺伝子の変異、発現の解析そして癌などの各種疾患の診断・治療等に使用される反応性材料およびその作製方法に関する。本発明は、DNA等の解析等にプローブ等として使用される、DNA断片、cDNA、ポリペプチド、オリゴヌクレオチド等の物質を基板に固定させた反応性チップ、または反応性物質を効率よく製造する方法、並びに同方法で製造された反応性チップ、または反応性物質に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 遺伝子の先天的異常に起因する遺伝病やDNAの突然変異等に起因する疾患、例えば、各種の癌の診断等にDNAチップが一部で使用されている。一方、各種生物のゲノム塩基配列の解読が進み、その知見に基づき遺伝子の機能解析を目的とする研究開発が一段と活発化してきている。ところで、遺伝子の機能解析には、遺伝子の個体差や変異、細胞内の発現の頻度などを、効率よく測定する技術の開発が求められている。そのような技術に使用されるものにDNAチップがある。

DNAチップは、通常の約1cm角の基板上に1万種類以上のDNA断片(DNAプローブ)を載せたものである。例えば、癌などの検査のために遺伝子の突然変異を検査する際に、所定のプローブを含むDNA断片が予め登載された上記チップ上に、蛍光標識したDNA断片からなる被検試料を添加すると、上記DNAチップ上の所定のプローブと相補的な配列を有する蛍光標識したDNA断片は、ハイブリダイゼーションを起こしてプローブと結合し、洗浄後も同チップ上に残される。このものに紫外線を照射すると、ハイブリダイゼーションにより固定されたものだけが蛍光を発するので、このものを同定することにより、被検試料中のDNA断片の配列や変異箇所を解明することができる。なお、この方法は、既に、一部癌遺伝子の突然変異の検出に使用されている。

【0003】 上記DNAチップの作成方法としては、一つには、半導体産業で使用されているフォトリソグラフィーの技術を応用したものがある。この方法は、フォトリソグラフィックマスクを使用して、所定のプローブを基板上で合成してオリゴヌクレオチドのDNAチップを製造する方法で、所定のプローブを登載したDNAチップを作成するためには、それに応じた莫大な数のフォ

トリソグラフィックマスクを製造しなければならず、そのコストだけでも膨大なものとなる。従って、固定するDNAプローブの種類が少數の場合には、所望とする数のフォトリソグラフィックマスクを製造し、これを使用して目的とするDNAチップを作成し、提供することは費用の点、工数の点を無視すれば、できないことではない。ところが、研究者が研究用に独自のDNAプローブをDNAチップ上に固定したい場合、高額なフォトリソグラフィックマスクを製造する設備を備えなければならず、実質的に不可能である。勢い、高価なフォトリソグラフィックマスクを製造する装置を有するところに、その作成を委嘱しなければならず、研究の秘密保持性や、研究費の捻出の点等から見て、特定の研究者にのみ可能な方法と言わざるを得ない。だからといって、所望するオリゴヌクレオチドを予め合成した合成品をスポットティングするのでは、何万種類以上を合成する必要があり、この方法も繁雑かつ、不経済である。

【0004】一方、所望のプローブ等の試料を特定基板上の所定の位置に登載する方法としては、所謂スポットティング方法があるが、このものは、羽ペンを使用するものであるために、スポットティングによる集積度を上げるには、限界がある。そこで、集積度を上げる方法としては、ピンおよびリング方式を利用した技術が知られている。しかしこの方法でも、スポットティング部材の先端部分の直径は、その製造技術上の物理的制約から最小化するとしても限度があり、最小でも一回のスポットティング量が1n1と大きく、高価な各種プローブを使用しなければならないDNAチップを製造する方法としては必ずしも好ましい方法とはいえない。さらに、スポットティング中におけるスポットティング用ピンの先端部が変形するという問題がある。先端部が変形すると当然スポットティング量も不規則とならざるを得ず、また、予め所定量のプローブ等を登載することが困難であり、定量用の目的には使用できないと言う問題がある。さらには、スポットティング速度が4スポット/秒とかかり、チップの製造に多大な時間を要する。ところで、特開平10-248599号公報には、スポットティング方法の変法の1つとして伸縮性の基材を使用し、その基材を少なくとも元の長さの2倍に延伸し、これにスポットティングする技術が提案されている。この方法は、伸縮性の基材を1次元又は2次元に、各延伸方向の長さを少なくとも延伸前の2倍に延伸し、基材表面上の拡大された各微小区分に同種または異種のDNA断片、酵素、抗原、抗体、エピトープまたはタンパク質等の反応性物質をスポットティングノズルを用いて一定数以上の反応性物質を一度に担持させ、次いで基材を延伸前の大きさに収縮させることによる、1cm<sup>2</sup>当たりの微小区分として少なくとも100個を有するである反応性チップを製造する方法である。所定のプローブを登載した反応性チップを作成するには、簡便な方法であるとすることができるが、製造に

際し、基板を延伸させる必要があるために作成に際しては習熟を要し、また、スポットティング速度も、フォトリソグラフィックマスクを使用する方法と比較すれば、早いものの、依然として、秒速4~10スポット程度であり、必ずしも製造速度が経済的なレベルに達しているとは言えない。さらに、反応性物質を新たに合成してプローブを作成する方法としては、スポットティングの度に延伸操作を繰り返すことが必要となるために、基板の物性からも、操作の煩雑性からも、実質的に不可能である。さらに、DNAの解析や、新たな遺伝子材料の創出には、少量のcDNA、ポリペプチド、オリゴヌクレオチドなどを用いて効率よく作成することが必要である。しかし現時点では、これらの物質を固定したチップ、およびこれらの物質そのものを効率よく製造する方法が提供されていないのが現状である。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】そこで本発明の目的は、DNA等の解析等にプローブ等として使用される、DNA断片、cDNA、ポリペプチド、オリゴヌクレオチド等の物質を基板に固定させた反応性チップおよび反応性物質を効率よく製造する方法、並びに同方法により製造されうる反応性チップおよび反応性物質を提供することにある。より具体的には、プローブの合成を伴うプローブの基板への登載（担持）にもフォトリソグラフィー設備を必要とせず、また、高価で、加えて、極めて限定的な量しか入手できない貴重な試料をプローブとして使用する場合でも、迅速で、確実に、かつ経済的に作製できるDNA断片等の、反応性物質を高集積度で集積した反応性チップを製造する方法、および同方法により製造されうる反応性チップ、並びにポリヌクレオチド、ペプチド等の反応性物質を迅速、かつ経済的に合成する方法および同方法により製造されうる反応性物質の提供にある。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】本発明は、基板上の所定のスポットに、所定量のヌクレオチド、cDNA、DNA断片、酵素、抗原、抗体、エピトープまたはタンパク質等の反応性物質を高速で、インクジェットノズルを使用して、供給し、スポット表面固定させることにより、所望とする反応性チップを製造すること、および基板上の所定のスポットに、所望とするヌクレオチド、cDNA、DNA断片、酵素、抗原、抗体、エピトープまたはタンパク質等の反応性物質を合成するための原料を高速で、インクジェットノズルを使用して、供給し、スポット表面および/または中間体と反応させることにより、所望とする反応性物質を製造することにより上記の目的を達成することを見いだして、本発明を完成させたものである。同方法によれば、反応性チップの製造は勿論、プローブ等として使用される可能性のあるペプチド等の反応性物質を、条件によっては、数千を超える種類

を同時に合成できる。

【0007】

【発明の実施の形態】 即ち、本発明によれば、第1に、反応性物質と反応する基板を用意し、同基板上の所望の位置に所定量の反応性物質を含む溶液を1スポット当たり5ピコリッター以上の量で少なくとも毎秒5個の割合で、少なくとも10個の吐出孔を有するノズルから吐出させることによって、所望とする反応性物質を基板に固定することからなる反応性チップの製造方法が、第2に、上記に記載の方法により製造された反応性チップが、第3に、反応性物質原料と反応する基板を用意し、同基板上の所望の位置に所定量の反応性物質原料を含む溶液を1スポット当たり5ピコリッター以上の量で少なくとも毎秒5個の割合で、少なくとも10個の吐出孔を有するノズルから吐出させることによって、所望とする反応性物質を基板上で合成し固定することからなる反応性チップの製造方法が、第4に、上記に記載の方法により製造された反応性チップが、第5に、反応性物質原料と反応する基板を用意し、同基板上の所望の位置に所定量の反応性物質原料を含む溶液を1スポット当たり5ピコリッター以上の量で少なくとも毎秒5個の割合で、少なくとも10個の吐出孔を有するノズルから吐出させることによって、所望とする反応性物質を基板上で合成し、次いで合成した反応物質を基板から分離することからなる反応性物質の製造方法が、第6に、上記に記載の方法により製造された反応性物質が提供される。

【0008】 本発明の第一、第二の側面は、反応性チップの簡便で経済的な製造方法、および同方法で製造される反応性チップに関する。第三の側面は、反応性物質の簡便で経済的な製造方法、および同方法で製造される反応性物質に関する。なお、本明細書において、反応性物質とは、新たな医薬品の創出や遺伝子診断、診断薬等に使用される、DNA断片、cDNA、ペプチド、オリゴヌクレオチド、酵素、抗原、抗体、エピトープ、タンパク質等の反応性物質を挙げることができるが、当然のことながらこれらに限定されるものではない。また、ここで固定とは、所定の条件下で、イオン結合や共有結合、水素結合、配位結合、ファンデアワールス力、化学吸着、物理吸着等による結合により相互に分離が不可能な状態で結合し、移動不可能な状態になることを言う。また、反応性物質とは、生体試料であるDNA断片、生理活性物質などと結合しうる物質をいい、具体的には、DNA断片、cDNA、酵素、抗体などを言う。さらに、反応性チップとは、上記のような反応性物質を基板上に登載、固定したものと言う。なお、ここで、基板とは、ガラス製のスライドグラス、シリコンなどを言う。勿論、基板の表面には、反応性物質との親和性等を付与する目的で、ポリL-アーリシン、シラン化等の適当な表面被覆処理を施してもよい。なお、通常、基板上に

は、その用途に応じて、1個当たりの容積が、通常は30ピコリッター容程度ある微細なスポットが少なくとも100個、好ましくは、1,000個以上、より好ましくは10,000個以上設けられている。

【0009】 本発明の第一の側面である反応性チップの製造方法は、所望の数のスポット、例えば、少なくとも5ピコリッター、好ましくは少なくとも30ピコリッター容のスポットを少なくとも100個形成した基板を用意し、同基板上の所望の位置に位置するスポットに、所望量の反応性物質を含む溶液を1スポット当たり5ピコリッター以上の量、好ましくは100ピコリッター以下の量を、少なくとも毎秒5個以上の速度で、少なくとも10個の吐出孔を有するジェットノズルから吐出させることによって、所望とする反応性物質を基板に固定することによる、反応性物質の製造方法に関する。より好ましくは、1cm<sup>2</sup>当たり少なくとも1,000個、好ましくは、10,000個程度のスポットを形成した基板を用意し、同基板上の所定位置に位置するスポットに、所定量のヌクレオチド、DNA断片、酵素、抗原、抗体、エピトープまたはタンパク質等の反応性物質の溶液を、上記の容量でかつ高速で、ジェットノズルから吐出し、所望のスポット所望とする反応性物質が固定されるまで、この吐出操作を繰り返すことによる、反応性物質を製造する方法に関する。

【0010】 ここで言う、ジェットノズルとは、圧電／電歪素子を利用したものをいい、所望数のノズル、例えば、少なくとも10、好ましくは、1,000個のノズルが設けられたカートリッジ式ノズルに所定の部材を登載して構成されるものである。より具体的には、本発明の出願人らに係る出願である特開平6-40030号公報に記載のインクジェット用ヘッドがノズルとして好適に使用される。吐出量などの調整は、予め組み込まれたCPU等により行えばよい。

【0011】 なお、上記のインクジェット用ヘッドとは、上記公報に記載の通り、インク粒子を噴射させる複数のノズル孔が設けられたインクノズル部材に対して、前記ノズル孔に対応する複数の空所が設けられたインクポンプ部材を重ね合わせて接合することにより、前記各ノズル孔の背後にそれぞれインク加圧室を形成し、該インク加圧室の壁部の一部を、圧電／電歪素子によって変形させて前記インク加圧室に圧力を生ぜしめることにより、該インク加圧室に供給されるインクを、前記ノズル孔より噴射させるようにしたインクジェットプリントヘッドにおいて、前記空所を形成する複数の窓部が設けられたスペーサープレートと、該スペーサープレートの一方の側に重ね合わされて前記窓部を覆蓋する閉塞プレートと、該スペーサープレートの他方の側に重ね合わされて前記窓部を覆蓋する、前記インクノズル部材のノズル孔に対応した位置に各々該ノズル孔への連通用開口部が設けられた接続プレートとを、それぞれグリーンシートにて

40  
20  
30  
40  
50

積層形成し、一体焼成せしめてなるセラミックス体により、前記インクポンプ部材を構成すると共に、前記閉塞プレートの外面上に膜形成法によって形成された電極および圧電／電歪層からなる圧電／電歪作動部により、前記圧電／電歪素子を構成したことを特徴とするインクジェットプリントヘッドを言う。

【0012】 上記のノズルを使用することにより、吐出特性が向上するだけでなく、一度に少なくとも1,000個、好ましくは、10,000個以上スポットティングできる。また、吐出速度も速いために、1,000個のノズルを形成させたものを使用した場合でも、1秒当たり、約10,000個のスポットティングが可能である。さらに、1スポット当たりの吐出量も非常に微量で、一回の吐出量は、通常、5～20ピコリッター(p1)であり、使用する高価で貴重な反応性物質の試料を高効率に使用することが可能となる。なお、反応性物質の供給は、インク供給路として設けられた供給路を介して行えばよく、試料は、同供給路に連結した試料供給用カートリッジに一時的に保存したものを同供給路を介して供給すればよい。なお、インクジェットとしての使用とは異なり、所定のスポット内に正確に吐出させると共に、近接するスポットへの飛散をさけるために、吐出圧を0.2～2(kgf/cm<sup>2</sup>)とすることが好ましい。0.2(kgf/cm<sup>2</sup>)以下だと、均一な吐出量が確保できず、また、2(kgf/cm<sup>2</sup>)を超えると近接するスポットに飛散する可能性があるので好ましくない。

【0013】 なお、本発明の第二の側面に係る方法においては、所望の反応性物質の製造用原料を供給することにより、固相法による核酸合成や、ペプチド合成も可能となる。つまり、上記の本発明の第一の側面に係る方法において採用される条件に準じて特定の試薬を順次供給しながら反応させることにより、所望の位置に所望の反応性物質、例えば、プローブ等として有用なオリゴヌクレオチド、ペプチドを極めて微量な量で数100～数万種類を搭載した反応性チップを製造することができる。上記のようにして合成された所望の反応性物質が固定された反応性チップを使用することにより、機能解析や診断や検査を容易に且つ正確にことができる。検査や診断に利用する場合には、基板を複数の区画に分割し、各分画毎に所望とするプローブを登載してもよく、また、その一部分にのみプローブを登載してもよい。つまりその目的に応じて、プローブの登載方法を任意に選択できることとなる。

【0014】 本発明の第三の側面に係る方法によれば、一度に、少量ではあるが数千を超える種類のペプチド、オリゴヌクレオチド等の反応性物質を迅速、かつ経済的に合成することが可能である。次に、この側面について説明することとする。この側面においては、通常は、固相反応が使用される。一般的に、固相反応による

ペプチドやオリゴヌクレオチドの合成条件そのものは、公知である（日本生化学会編 生化学実験講座第一巻「タンパク質の化学IV 化学修飾とペプチド合成」P. 401～P. 419 東京化学同人、および生化学実験講座第一巻続編 遺伝子研究I 「核酸の化学と分析技術」P. 16～P. 33 東京化学同人参照）。例えば、同文献に記載されているカラムに変え、基板を使用し、基板上の所定のスポットに出発原料である、反応性物質の製造用原料、例えば、オリゴヌクレオチドであればアデニン等のモノヌクレオチドの3'末端を固定し、このものに、予め5'末端以外の水酸基はトリチル基で保護されたモノヌクレオチドを上記方法を用いてスポットティングして、反応させ、未反応のモノヌクレオチドは洗浄して流し、次いで同様な手順で、次々とモノヌクレオチドを添加反応させ、所望とするオリゴヌクレオチドの反応性物質を合成する。

【0015】 より具体的には、この方法は、例えば、微細な凹部であるスポットが表面に形成されている基板、例えば、少なくとも30ピコリッター容のスポットを少なくとも100個形成した基板を用意し、基板上の所望の位置に位置する各スポットに所望の出発原料である反応性物質の出発原料を固定し、このものに、順次所望とする材料を所定量含む溶液を1スポット当たり5～20ピコリッターの量で少なくとも毎秒1000個の割合で、少なくとも1,000個の吐出孔を有するインクジェットノズルから吐出させ、反応させ、未反応の材料を洗浄除去し、以下、所望のスポットすべてに、所望とする反応性物質が形成される迄、この吐出-反応-洗浄除去操作を繰り返して、目的とする反応性物質が基板上の所望の位置するスポットに合成されるまで、次々と所望とする原料を添加反応させることよりなる、反応性物質の製造方法である。なお、この第三の側面で製造される反応性物質としては、オリゴヌクレオチド、ペプチド等が挙げられる。かくして、合成したオリゴヌクレオチド等の反応性物質は、基板に固定した状態で、上述の如く反応性チップとして用いてもよいが、適当な処理、例えば、酸やアルカリで処理することにより、基板から分離して、そのものを回収し、各種試験・検査用の試薬等として使用してもよい。本発明の第三の側面によれば、一度に、複数、場合によっては、千以上の種類のオリゴヌクレオチド、ペプチド等を手軽に合成することができる。かくして、本発明の第三の側面に係る方法により製造されうるものとして、基板上で合成され、固定された反応性物質を分離して得られる反応性物質が提供されることとなる。

【0016】 図1(a)～(h)は、オリゴヌクレオチドを合成するときの、各モノヌクレオチドを添加する手順を模式的に示した図である。先ず保護基の付いた、それぞれの塩基、アデニン(以下Aで表す)、グアニン(以下Gで表す)、チミン(以下Tで表す)、およびシ

トシン（以下Cで表す）を収納した1,000個の吐出孔を有する吐出用のノズル4本及び反応条件を変化させるのに必要なバッファー用のノズルを必要数用意し、図2に示したように順序よくA、G、C、およびTを添加し基板に固定する。固定は常法に従えばよいが、例えば、表面をシラン化したガラス基板を使用し、この上に、所定の反応させる基以外は保護基で保護したモノヌクレオチドを図1（a）～（d）に模式的に示したように順次添加、固定させ、次いで、図1（e）～（h）に模式的に示したように基板を移動させた後、反応させる基以外は保護基で保護した所望のモノヌクレオチドを順次添加し、反応させる。この操作を繰り返すことにより、通常は、先に記載した文献の記載の条件に従えば、アミダイト法の場合で、塩基数が100量体のものが、また、トリエステル法の場合で、塩基数が30～40量体の所望のオリゴヌクレオチドが合成される。

【0017】 第二の側面に関する反応性チップは、基板上に、所望とする反応性物質が所望量登載された高集積度の反応性チップである。本発明のこの側面に関する反応性チップは、一つのスポット上には、僅かに5～20ピコリッター（p1）の量の試料が登載されている過ぎないので、高価で、かつ、貴重なバイオ試料を有効に利用することができる。勿論、1つ当たりの搭載量が所定量の試料を含んだ溶液の状態で5～20ピコリッターと極めて少量であるので、当然のことながら、単位面積当たりのスポットの数も既存の反応性チップとは、大きく異なる。従来技術であるリソグラフィーを利用した方法やスポットティング方法と比較して、その集積度は、少なくとも10倍、好ましくは、100倍以上である。換言すれば、集積度を上げた状態では、1cm<sup>2</sup>当たり少なくとも10,000個、好ましくは、100,000個の反応性物質が登載されることとなる。勿論、用途によっては、基板上に設けるスポットの数はこれよりも少なくともよく、例えば、100個程度でもよい。ただし、1個のスポットの容積は、5～20ピコリッターのプローブ等の溶液を収納できるに充分な容積が確保されればよい。

【0018】 従って、1個のスポットの容積は、少なくとも5ピコリッター容あれば充分である。また、本発明の第二の側面である上記方法により、所望とするペプチド、ヌクレオチド等の反応性物質を基板上の所定位置に合成することができる遺伝子の変異分析や機能解析、創薬開発に必要な反応性チップを、また、所望とするプローブ等を予め定められた場所に固定した、臨床試験や治療診断に必要な反応性チップをも容易に製造し、提供することができる。勿論、一定の濃度の反応液を使用すれば、所定量のプローブ等を合成、固定することができるので、定量検査にも使用可能である。また、第三の側面に関する反応性物質は、本発明の第三の側面に係る方法により、合成されうる反応性物質をいい、こ

れら反応性物質は、少量ではあるが、一度に、合成される多種類のポリペプチド、オリゴヌクレオチド等の物質である。

【0019】

【実施例】 以下、本発明を実施例によりさらに説明する。

（実施例） 1. プローブの合成を伴う反応性チップの製造

10 1cm×1cmの大きさのガラス製スライドグラス上に、10,000（100×100）個のスポットが形成されたものを基板として使用し、1000（100×25）個の吐出孔を有するノズルを4種類用意し、それぞれに保護基の付いたA、G、C、およびTを供給できるように供給路を介して試薬貯蔵槽が設けられて圧電／電歪素子を有する装置を用意し、図1に示したような順序で、A、G、C、およびTをスポットティングした。まず、A原料の入ったカートリッジを移動させ、所定のスポットにA原料を供給した。次に、A原料の入ったカートリッジが次の基板へ移って同じように所定のスポットに供給した。次に、G原料の入ったカートリッジが次の位置にG原料をスポットした。以降、T原料、C原料の入ったカートリッジが順番に動いてスポットした。第一塩基が合成された後、この一連の操作を18回繰り返し、合成された18量体のオリゴヌクレオチドが一定の規則性で登載された多数の反応性チップを得た。これにより、フォトリソグラフィーを用いる方法では、製造1ロット数十枚であったのが、数100チップ以上の製造が迅速に行え、チップの量産化が可能となった。なお、保護基の着脱などを含め一般的な合成条件については、30 先に記載した文献に記載の条件に従った。

【0020】 2. 酵素を使用した反応性チップの製造例

上記1と同じ基板に、吐出用ノズル装置の試料貯蔵槽中に酵素を含む溶液を収納した。吐出ノズルを作動させ、酵素を含む溶液を、各溶液が他の溶液と接触しないように各スポットに担持させた。次いで、スポットに担持されている溶液から溶媒を蒸発させて、酵素のみがスポットに担持された本発明の反応性チップを得た。これにより約1cm×1cmの大きさの基板上に、10,000個の酵素のドットが独立して担持された反応性チップが得られた。吐出操作は、数分も掛からずに終了し、また、全体作業時間は、僅かに、1時間程度で極めて効率的であった。

【0021】

【発明の効果】 本発明によれば、フォトリソグラフィー設備等の特別な設備を要することなく、DNA断片等の反応性物質をその表面に集積した反応性チップを容易に提供することができる。また、スポットティング方法の様に製造技術上の物理的制約から最小化するとしても限度がある為に、スポットティング部材の先端部分の直径

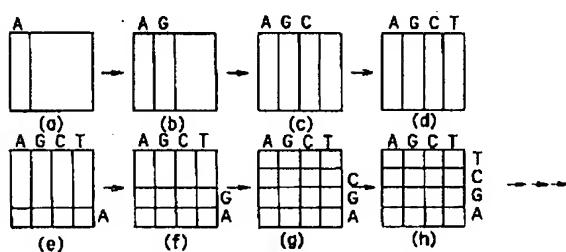
は、最小でも一回のスポットティング量が1nlと大きく、必然的に高価な各種プローブを大量に使用しなければならないこともなく、一回のスポットティング量は、同一数のスポットに対して200分の1から50分の1程度である5~20plと極めて少ない。この点でスポットティング方法と比較しても、遙かに経済的であることが明らかである。加えて、10,000スポットを有する\*

\* 反応性チップを製造するに要する時間を、溶媒の乾燥時間を入れたとしても、僅かに、1時間程度であり、極めて効率的であることを明らかである。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明に係るオリゴヌクレオチド製造方法の手順を模式的に示す。

【図1】




---

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		識別記号	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N	1/00	1 0 1	G 0 1 N	1/10
	1/10			31/22
31/22		1 2 1		33/566
33/566				35/02
35/02			C 1 2 M	1/34
35/10				E
// C 1 2 M	1/34		C 1 2 N	15/00
				A
			G 0 1 N	35/06
				A

F ターム(参考) 2C042 AA10 FA20 FB05 HA02  
 2C058 AA09 CC02 CC11 EA11 EB00  
 ED12 ED17 GA01  
 4B024 AA11 AA20 BA07 BA31 BA41  
 BA61 CA01 CA04 CA09 CA11  
 HA14 HA19  
 4B029 AA07 AA21 BB15 BB16 BB17  
 CC03 CC08 FA01  
 4B063 QA01 QA08 QA17 QA18 QA19  
 QQ01 QQ12 QQ13 QQ21 QQ42  
 QQ52 QQ58 QQ79 QQ96 QR32  
 QR35 QR48 QR55 QR66 QR84  
 QS33 QS34 QS36 QS39 QX02  
 4H045 AA10 AA20 DA75 DA86 DA89  
 EA50 FA80

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-116750

(43)Date of publication of application : 27.04.2001

(51)Int.Cl.

G01N 33/53  
C07K 1/04  
C12N 15/09  
C12Q 1/00  
C12Q 1/68  
G01N 1/00  
G01N 1/10  
G01N 31/22  
G01N 33/566  
G01N 35/02  
G01N 35/10  
// C12M 1/34

(21)Application number : 11-299803

(71)Applicant : NGK INSULATORS LTD

(22)Date of filing : 21.10.1999

(72)Inventor : YAMADA SAICHI  
KAWASE MITSUO

**(54) METHOD FOR MANUFACTURING REACTIVE CHIP, REACTIVE CHIP  
MANUFACTURED BY THE METHOD AND REACTIVE SUBSTANCE**

(57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a method in which a reactive chip is manufactured in such a way that a reactive substance such as a DNA fragment or the like which can be prepared economically is integrated with a high integration degree by a method wherein a photolithographic installation is not required when a probe is synthesized or when the probe is mounted on a substrate, a sample such as the high-cost and valuable DNA fragment or the like capable of being obtained only in an extremely limited amount is used as the probe and the sample is used quickly, surely and in an extreme trace amount, to provided a reactive chip which is manufactured by the method, to provide a method in which a reactive substance such as a DNA fragment or the like is synthesized quickly and economically and to provide a reactive substance which is manufactured by the method.

**SOLUTION:** A reactive substance such as a DNA fragment or the like in a prescribed amount is mounted, at high speed and by using a jet nozzle, on a prescribed spot on a substrate on which spots in the prescribed number are formed. Thereby, a reactive chip in which the reactive substance is integrated on its surface with a high integration degree is manufactured. By using a method for its manufacture, reactive substances such as peptides or the like in a small amount but in kinds exceeding several thousands are synthesized at a time, quickly and economically.

**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination] 24.07.2003

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 07.02.2006

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

**\* NOTICES \***

**JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.**

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.

3. In the drawings, any words are not translated.

---

**CLAIMS**

---

**[Claim(s)]**

[Claim 1] The manufacture approach of the reactant chip which consists of fixing the active substance considered as a request by making it breathe out from the nozzle which prepares the active substance and the substrate which reacts, has the solution which contains the active substance of the specified quantity in the location of the request on this substrate in the amount beyond 5 pico l., and has at least ten discharge openings at a rate of per second five pieces at least per one spot to a substrate.

[Claim 2] It is the manufacture approach of the reactant chip according to claim 1 which is that to which a substrate is glass or a product made from silicon, and surface preparation of the front face is carried out for compatibility grant.

[Claim 3] The manufacture approach of the reactant chip according to claim 1 which is at least one sort chosen from the group which the active substance becomes from a DNA fragment, cDNA, RNA, an enzyme, an antigen, an antibody, an epitope, protein, a polynucleotide, and a peptide.

[Claim 4] The manufacture approach of a reactant chip according to claim 1 that a substrate is what has 10,000 spots even if few [, per two ] 1cm.

[Claim 5] The reactant chip which it is manufactured by any 1 term of claims 1-4 by the approach of a publication, and is sold to it.

[Claim 6] The manufacture approach of the reactant chip which consists of compounding the active substance considered as a request by making it breathe out from the nozzle which prepares an active substance raw material and the substrate which reacts, has the solution which contains the active substance raw material of the specified quantity in the location of the request on this substrate in the amount beyond 5 pico l., and has at least ten discharge openings at a rate of per second five pieces at least per one spot on a substrate, and fixing.

[Claim 7] It is the manufacture approach of the reactant chip according to claim 6 which is that to which a substrate is glass or a product made from silicon, and surface preparation of the front face is carried out for compatibility grant.

[Claim 8] The manufacture approach of a reactant chip according to claim 6 that the active substance is at least one sort chosen from the group which consists of a polynucleotide and a peptide.

[Claim 9] The manufacture approach of a reactant chip according to claim 6 that a substrate is what has 10,000 spots even if few [, per two ] 1cm.

[Claim 10] The reactant chip which it is manufactured by any 1 term of claims 6-9 by the approach of a publication, and is sold to it.

[Claim 11] The manufacture approach of the active substance which consists of separating the reacting matter which compounded the active substance considered as a request by making it breathe out from the nozzle which prepares an active-substance raw material and the substrate which reacts, has the solution which contains the active-substance raw material of the specified quantity in the location of the request on this substrate in the amount beyond 5 pico l., and has at least ten discharge openings at a rate of per second five pieces at least per one spot on the substrate, and subsequently compounded it from a substrate.

[Claim 12] It is the manufacture approach of the active substance according to claim 11 which is that to which a substrate is glass or a product made from silicon, and surface treatment of the front face is carried out for compatibility grant.

[Claim 13] The manufacture approach of the active substance according to claim 11 that the active substance is at least one sort chosen from the group which consists of a polynucleotide and a peptide.

[Claim 14] The manufacture approach of the active substance according to claim 11 that a substrate is what has 10,000 spots even if few [, per two ] 1cm.

[Claim 15] The active substance which it is manufactured by any 1 term of claims 11-14 by the approach of a publication, and is sold to it.

---

[Translation done.]

**\* NOTICES \***

**JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.**

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

**DETAILED DESCRIPTION**

---

**[Detailed Description of the Invention]****[0001]**

[Field of the Invention] This invention relates to the reactant ingredient used for a diagnosis, therapy, etc. of various diseases, such as functional analysis of DNA, variation of a gene, analysis of a manifestation, and cancer, and its production approach. This invention relates to the reactant chip for which matter, such as the DNA fragment and cDNA which are used for analyses, such as DNA, etc. as a probe etc., a polypeptide, and an oligonucleotide, was made to fix to a substrate or the method of manufacturing the active substance efficiently, the reactant chip manufactured by the list by this approach, or the active substance.

**[0002]**

[Description of the Prior Art] The DNA chip is partly used for the diagnosis of the disease resulting from the hereditary disease which originates unusually by nature [ a gene ], the mutation of DNA, etc., for example, various kinds of cancers, etc. On the other hand, decode of the genome base sequence of various living things progresses, and researches and developments aiming at the functional analysis of a gene have been activating much more based on the knowledge. By the way, the functional analysis of a gene is asked for development of the technique which measures efficiently the individual difference of a gene, the frequency of the manifestation by variation and intracellular, etc. A DNA chip is one of those which are used for such a technique. A DNA chip carries 10,000 or more kinds of DNA fragments (DNA probe) on the substrate of the usual about 1cm angle. For example, if the specimen with which the DNA fragment containing a predetermined probe consists of a DNA fragment which carried out fluorescent labeling on the above-mentioned chip recorded beforehand is added in case the mutation of a gene is inspected for inspection, such as cancer, the predetermined probe on the above-mentioned DNA chip and the DNA fragment which has a complementary array and which carried out fluorescent labeling will start hybridization, and will combine it with a probe, and after washing will be left behind on this chip. If ultraviolet rays are irradiated at this thing, since only what was fixed by hybridization will emit fluorescence, the array and variation part of a DNA fragment in a specimen can be solved by identifying this thing. In addition, this approach is already used for detection of the mutation of an oncogene in part.

[0003] As the creation approach of the above-mentioned DNA chip, there is a thing adapting the technique of the photolithography currently used by semiconductor industry in one. This approach is an approach of using a photolithographic mask, compounding a predetermined probe on a substrate, and manufacturing the DNA chip of an oligonucleotide, in order to create the DNA chip which recorded the predetermined probe, must manufacture an immense number according to it of photolithographic masks, and will become huge [ that cost ]. Therefore, when the class of DNA probe to fix is a fraction, a number of photolithographic masks considered as a request will be manufactured, the target DNA chip will be created using this, and providing will not be being unable to do if the point of costs and the point of manday are disregarded. However, when a researcher wants to fix a DNA probe original with research on a DNA chip, it must have the facility which manufactures a large sum photolithographic mask, and is substantially impossible. It must entrust with the creation, it cannot but see from the secrecy holdout of research, the point of working out of a research cost, etc., and a possible approach must be told only to a specific researcher at the place which has equipment which manufactures vigor and an expensive photolithographic mask. even so, spotting the synthetic compounds which compounded beforehand the oligonucleotide for which it asks -- if -- it is necessary to compound what 10,000 or more kinds, and this approach is also complicated -- and it is uneconomical.

[0004] On the other hand, as an approach of recording samples, such as a desired probe, in the position on a specific substrate, although there is the so-called spotting approach, this thing has a limitation, in order to raise the degree of integration by spotting, since it is what uses a feather pen. Then, as an approach of raising a degree of integration, the technique using a pin and a ring method is known. However, also by this approach, though the diameter for a point of a spotting member is minimized from the physical constraint on that manufacturing technology, it is limited, and min is also as large as 1nl and cannot necessarily say 1 time of the amount of spotting with a desirable approach as an approach of manufacturing the DNA chip which must use expensive, various probes. Furthermore, there is a problem that the point of the pin for spotting under spotting deforms. if a point deforms, naturally the amount of spotting is also irregular -- not becoming -- there is a problem said that it is difficult not to obtain and to record the probe of the specified quantity etc. beforehand, and it cannot use it for the object for quanta. Furthermore, a spotting rate is applied with 4 spots / second, and manufacture of a chip takes great time amount. By the way, the base material of elasticity is used as one of the strange methods of the spotting approach, the base material is extended the twice of the original die length at least, and the technique of spotting to this is proposed by JP,10-248599,A. This approach extends the base material of elasticity to-dimensional [ 1 ] or two-dimensional, and extends each drawing lay length the twice before a drawing at least. In each minute partition to which it was expanded on the base material front face, congener or a DNA fragment of a different kind, The active substance more than fixed numbers is made to support the active substance, such as an enzyme, an antigen, an antibody, an epitope, or protein, at once using a spotting nozzle. Subsequently, it is the approach of consisting of shrinking the magnitude before extending a base material of having at least 100 pieces as a minute partition per two 1cm and of coming out and manufacturing a certain reactant chip. Although it is a simple approach, and it is early if it compares with the approach require mastery on the occasion of creation, and a spotting rate also uses a photolithographic mask in order to make a substrate extend on the occasion of manufacture, it is speed per second four to 10 spot extent, and do not still suppose [ in order to create the reactant chip which recorded the predetermined probe, ] that the manufacture rate has reached economical level necessarily. Furthermore, since it is necessary as an approach of newly compounding the active substance and creating a probe to repeat drawing actuation at every spotting, it is substantially impossible also from the complicated nature of actuation also from the physical properties of a substrate. Furthermore, it is required for the analysis of DNA, and creation of new gene stock to create efficiently using little cDNA, a polypeptide, an oligonucleotide, etc. However, the actual condition is that the chip which fixed these matter, and the method of manufacturing these matter itself efficiently are not offered at present.

[0005]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] Then, the object of this invention is to offer the reactant chip and the active substance which are manufactured by this approach by the approach and list which are manufactured efficiently, and sell to them the reactant chip and the active substance which are used for analyses, such as DNA, etc. as a probe etc., and which made matter, such as a DNA fragment, cDNA, a polypeptide, and an oligonucleotide, fix to a substrate. Need [ for the registration (support) to the substrate of the probe accompanied by composition of a probe ] a photolithography facility more specifically and are expensive. In addition, even when using as a probe the precious sample which can obtain only a very restrictive amount, are quick. How to manufacture the reactant chip which accumulated the active substance, such as a DNA fragment producible certainly and economically, with the high degree of integration, And it is in offer of the active substance which is manufactured by the reactant chip in which it is manufactured by this approach and deals, and the list by the approach and this approach of compounding promptly and economically, and sells the active substance, such as a polynucleotide and a peptide, to them.

[0006]

[Means for Solving the Problem] This invention is a high speed at the predetermined spot on a substrate about the active substance, such as the nucleotide of the specified quantity, cDNA, a DNA fragment, an enzyme, an antigen, an antibody, an epitope, or protein. By using, supplying and carrying out spot surface immobilization of the ink jet nozzle At the predetermined spot on manufacturing the reactant chip considered as a request, and a substrate The raw material for compounding the active substance, such as the nucleotide considered as a request, cDNA, a DNA fragment, an enzyme, an antigen, an antibody, an epitope, or protein, at high speed By using and supplying an ink jet nozzle and making it react with a spot front face and/or intermediate field, by manufacturing the active substance considered as a request, it finds out attaining the above-mentioned object and this invention is completed.

According to this approach, the class which exceeds thousands for the active substance, such as a peptide which may be used as a probe etc., as well as manufacture of a reactant chip depending on conditions is simultaneously compoundable.

[0007]

[Embodiment of the Invention] According to this invention, at least the solution which prepares the active substance and the substrate which reacts and contains [ 1st ] the active substance of the specified quantity in the location of the request on this substrate in the amount beyond 5 pico l. per one spot namely, at a rate of per second five pieces By making it breathe out from the nozzle which has at least ten discharge openings The manufacture approach of the reactant chip which consists of fixing to a substrate the active substance considered as a request The reactant chip manufactured [ 2nd ] by the above by the approach of a publication to the 3rd At least the solution which prepares an active substance raw material and the substrate which reacts, and contains the active substance raw material of the specified quantity in the location of the request on this substrate in the amount beyond 5 pico l. per one spot at a rate of per second five pieces By making it breathe out from the nozzle which has at least ten discharge openings The manufacture approach of the reactant chip which consists of compounding on a substrate the active substance considered as a request, and fixing The reactant chip manufactured [ 4th ] by the above by the approach of a publication to the 5th At least the solution which prepares an active substance raw material and the substrate which reacts, and contains the active substance raw material of the specified quantity in the location of the request on this substrate in the amount beyond 5 pico l. per one spot at a rate of per second five pieces By making it breathe out from the nozzle which has at least ten discharge openings The active substance by which the manufacture approach of the active substance which consists of separating from a substrate the reacting matter which compounded on the substrate the active substance considered as a request, and subsequently compounded it was manufactured [ 6th ] by the above by the approach of a publication is offered.

[0008] The second side face is related with the reactant chip in which it is manufactured by the simple and economical manufacture approach and this approach of a reactant chip, and deals for a start [ of this invention ]. The third side face is related with the active substance in which it is manufactured by the simple and economical manufacture approach and this approach of the active substance, and deals. In addition, in this description, it is not limited to these with being natural although the active substance can mention the active substance, such as the DNA fragment and cDNA which are used for creation of new drugs, gene diagnosis, a diagnostic drug, etc., a peptide, an oligonucleotide, an enzyme, an antigen, an antibody, an epitope, and protein. Moreover, under predetermined conditions, it joins mutually together in the inseparable condition by association by ionic bond, covalent bond, hydrogen bond, a coordinate linkage, Van der Waals force, chemical absorption, physical adsorption, etc., and immobilization means that it will be in the condition which cannot move here. Moreover, the active substance means the matter which can be combined with the DNA fragment which is a biological material, a physiological active substance, etc., and, specifically, means a DNA fragment, cDNA, an enzyme, an antibody, etc. Furthermore, a reactant chip means what recorded and fixed the above active substance on the substrate. In addition, a substrate means a glass slide glass, silicon, etc. here. Of course, on the surface of a substrate, suitable surface coating processing of a Pori L-lysine, silanizing, etc. may be performed in order to give compatibility with the active substance etc. In addition, on the substrate, at least 100 detailed spots [ 1,000 or more / 10,000 or more ] which usually have the volume per piece a 30pico liter \*\* grade are usually more preferably prepared according to the application.

[0009] The manufacture approach of the reactant chip which is the first side face of this invention A desired number of spots, for example, at least 5pico l. and the substrate which formed at least 100 spots of 30 pico l. \*\* at least preferably, are prepared. It is the rate of per second five or more pieces at least about the amount not more than 100 pico l. preferably. the solution which contains the active substance of the amount of requests in the spot located in the location of the request on this substrate -- per one spot -- the amount beyond 5 pico l. -- By making it breathe out from the jet nozzle which has at least ten discharge openings, it is related with the manufacture approach of the active substance which consists of fixing to a substrate the active substance considered as a request. Even if few [ per two ] 1cm, 1,000 pieces more preferably preferably At the spot which prepares the substrate in which about 10,000 spots were formed and is located in the predetermined location on this substrate The solution of the active substance, such as the nucleotide of the specified quantity, a DNA fragment, an enzyme, an antigen, an antibody, an epitope, or protein, by the above-mentioned capacity at and a high speed It is related with the approach of consisting of repeating this regurgitation actuation of manufacturing the active substance

until discharge and the active substance considered as a desired spot request are fixed from a jet nozzle. [0010] The jet nozzle said here means the thing using piezo-electricity / electrostriction component, records a predetermined member at the nozzle of the number of requests, at least 10 [ for example, ], and the cartridge-type nozzle in which 1,000 nozzles were prepared preferably, and it is constituted. More specifically, the head for ink jets of a publication is suitably used for JP,6-40030,A which is application concerning the applicants of this invention as a nozzle. What is necessary is for CPU incorporated beforehand just to perform adjustment of discharge quantity etc.

[0011] In addition, with the above-mentioned head for ink jets, the ink nozzle member in which two or more nozzle holes which make the above-mentioned official report inject an ink particle as a publication were prepared is received. By piling up the ink pump member in which two or more dead air space corresponding to said nozzle hole was established, and joining By forming an ink pressurized room behind said each nozzle hole, respectively, making a part of wall of this ink pressurized room transform by piezo-electricity / electrostriction component, and making said ink pressurized room produce a pressure In the ink jet print head it was made to make the ink supplied to this ink pressurized room inject from said nozzle hole The spacer plate with which two or more window parts which form said dead air space were prepared, and the lock out plate which puts on this one spacer plate side, and covers said window part, Put on the another side side of this spacer plate, and cover said window part. With the ceramic object which laminating formation is carried out [ object ] with a green sheet, respectively, and makes it really come to calcinate the connection plate with which opening for a free passage to this nozzle hole was respectively prepared in the location corresponding to the nozzle hole of said ink nozzle member While constituting said ink pump member, the ink jet print head characterized by constituting said piezo-electricity / electrostriction component by the piezo-electricity / electrostriction actuation section which consists of the electrode, and the piezo-electricity/electrostriction layer formed by the film forming method on the outside surface of said lock out plate is said.

[0012] A regurgitation property not only improves, but by using the above-mentioned nozzle, it can spot 10,000 or more pieces preferably at least 1,000 pieces at once. Moreover, since a regurgitation rate is also quick, even when the thing in which 1,000 nozzles were made to form is used, about 10,000 spotting per second is possible. Furthermore, it becomes possible to use dramatically the sample of the expensive and precious active substance which 1 time of discharge quantity is usually 5-20picol. (pl), and is used efficient in a minute amount also for the discharge quantity per one spot. In addition, a sample should just supply what was saved temporarily at the cartridge for sample supply connected with this supply way through this supply way that what is necessary is just to perform supply of the active substance through the supply way prepared as an ink supply way. In addition, while making accuracy breathe out in a predetermined spot unlike the activity as an ink jet, in order to avoid scattering to the approaching spot, it is desirable to set a discharge pressure to 0.2-2 (kgf/cm<sup>2</sup>). Since it may disperse at the spot which approaches if uniform discharge quantity cannot be secured if it is below 0.2 (kgf/cm<sup>2</sup>), and 2 (kgf/cm<sup>2</sup>) is exceeded, it is not desirable.

[0013] In addition, in the approach concerning the second side face of this invention, the nucleic acid biosynthesis by the solid phase technique and peptide synthesis also become possible by supplying the raw material for manufacture of the desired active substance. That is, it becomes possible to manufacture the reactant chip which carried several 100 - 10,000 kinds of numbers for the oligonucleotide useful as the desired active substance, for example, a probe etc., and the peptide in the desired location in the very minute amount amount by making it react, carrying out sequential supply of the specific reagent according to the conditions adopt in the approach concerning the first side face of above-mentioned this invention. By using the reactant chip with which the active substance of the request compounded as mentioned above was fixed, functional analysis, diagnosis, and inspection can be easily made into accuracy. When using for inspection or a diagnosis, a substrate may be divided into two or more partitions, and the probe considered as a request for every fractionation may be recorded, and a probe may be recorded only in the part. That is, the registration approach of a probe can be chosen as arbitration according to the object.

[0014] According to the approach concerning the third side face of this invention, it is possible to compound promptly and economically at once the active substance, such as a peptide of the class which exceeds thousands although it is little, and an oligonucleotide. Next, suppose that this side face is explained. In this side face, solid phase reaction is usually used. Generally, the synthetic condition of a peptide or an oligonucleotide by solid phase reaction itself is well-known (proteinic chemistry IV chemical modification, and 401 - P.419 Tokyo Kagaku Dojin and the first volume sequel of a first

volume "peptide synthesis" P. biochemistry experiment lecture refer to genetic-research I "chemistry [ of a nucleic acid ] and analytical skill" P.16 - P.33 Tokyo Kagaku Dojin). [ of biochemistry experiment lecture edited by the Japanese Biochemical Society ] For example, it changes into the column indicated by this reference, a substrate is used, and it is a start raw material at the predetermined spot on a substrate. If it is the raw material for manufacture of the active substance, for example, an oligonucleotide, the three-dash terminal of mononucleotides, such as an adenine, is fixed. To this thing Beforehand, hydroxyl groups other than a five prime end spot the mononucleotide protected by the trityl radical, and make it react using the above-mentioned approach, unreacted mononucleotide washes, and they are a sink and the procedure same subsequently. The active substance of the oligonucleotide which is made to carry out the addition reaction of the mononucleotide one after another, and is considered as a request is compounded.

[0015] This approach more specifically For example, the substrate with which the spot which is a detailed crevice is formed in the front face, The substrate which formed at least 100 spots of 30 pico l. \*\* at least is prepared, and the start raw material of the active substance which is a desired start raw material is fixed to each spot located in the location of the request on a substrate. For example, to this thing At least a specified quantity \*\*\*\* solution in a 5-20pico l. [ per one spot ] amount for the ingredient considered as a sequential request at a rate of per second 1000 pieces It is made to breathe out from the ink jet nozzle which has at least 1,000 discharge openings. Make it react and carry out washing clearance of the unreacted ingredient, and hereafter, this regurgitation-reaction-washing clearance actuation is repeated until the active substance considered as a request at all desired spots is formed. It is the manufacture approach of the active substance which consists of carrying out the addition reaction of the raw material considered as a request one after another until the target active substance is compounded by the spot in which the request on a substrate is located. In addition, an oligonucleotide, a peptide, etc. are mentioned as the active substance manufactured on this third side face. In this way, although the active substance, such as a compound oligonucleotide, is in the condition fixed to the substrate and may be used as a reactant chip like \*\*\*\*, by processing by suitable processing, for example, an acid and alkali, it may dissociate from a substrate, and it may collect the very thing, and may use them as various trials, a checking reagent, etc. According to the third side face of this invention, depending on plurality and the case, the oligonucleotide of 1000 or more classes, a peptide, etc. are easily compoundable at once. The active substance which is compounded and is obtained by separating the fixed active substance on a substrate as that in which it is manufactured in this way by the approach concerning the third side face of this invention, and deals will be offered.

[0016] Drawing 1 (a) - (h) is drawing having shown typically the procedure which adds each mononucleotide when compounding an oligonucleotide. Required-number preparation of the nozzle required to change four nozzles and reaction condition for regurgitation which have 1,000 discharge openings to which the protective group was attached first, and which contained each base, the adenine (it expresses with Following A), the guanine (it expresses with Following G), the thymine (it expresses with Following T), and the cytosine (it expresses with Following C) for buffers is carried out, and as shown in drawing 2, A, G, C, and T are added in good order, and it fixes to a substrate. Although immobilization should just follow a conventional method, the glass substrate which silanized the front face is used, for example. Besides, sequential-add and it is made to fix except the radical which predetermined makes react, as the mononucleotide protected by the protective group was typically shown in drawing 1 (a) - (d). Subsequently Drawing 1 (e) As typically shown in - (h), after moving a substrate, sequential addition is carried out and the mononucleotide of the request protected by the protective group is made to react except the radical made to react. In the case of an aminodite method, in the case of a triester method, if the conditions of a publication of the reference usually indicated previously are followed by repeating this actuation, the oligonucleotide of a request of the number of bases of 30 - 40 \*\*\*\* will be compounded [ the number of bases ] for the thing of 100 \*\*\*\* again.

[0017] The reactant chip about the second side face is a reactant chip of a high degree of integration with which the amount registration of requests of the active substance considered as a request on a substrate was carried out. On one spot, it passes, and the reactant chip about this side face of this invention is that for which the sample of the amount of 5-20picol. (pl) is recorded slightly and which is twisted, and can use a precious biotechnology sample effectively at an expensive price. Of course, the reactant chips of 5-20pico l. and existing [ the number of the spots per unit area ] with natural, since it is very little differ greatly in the state of the solution with which the amount of loading per one contained the sample of the specified quantity. As compared with the approach and the spotting approach of having used the

lithography which is the conventional technique, the degree of integration is 100 or more times preferably at least 10 times. If it puts in another way, where a degree of integration is raised, even if few [ per two ] 1cm, the 10,000 active substance [ 100,000 ] will be recorded preferably. Of course, the number of the spots prepared on a substrate depending on an application may be better than this at least, for example, about 100 pieces are sufficient as it. However, sufficient volume for the volume of one spot to be able to contain solutions, such as 5-20pico l. of a probe etc., should just be secured.

[0018] therefore, the volume of one spot -- at least -- 5 pico l. \*\*\*\*\* -- it is enough. Moreover, since it becomes possible to compound the active substance which considers as a request, such as a peptide and a nucleotide, in the predetermined location on a substrate by the above-mentioned approach of being the second side face of this invention, it can manufacture easily and a reactant chip required for the clinical trial and the therapy diagnosis which fixed the probe which considers a reactant chip required for variation analysis and the functional analysis of a gene, and innovative drug development development as a request again to the location which was able to be appointed beforehand can also provide. Of course, if the reaction mixture of fixed concentration is used, since the probe of the specified quantity etc. can be compounded and it can fix, it is usable also to quantum inspection. Moreover, the active substance in which the active substance about the third side face is compounded by the approach concerning the third side face of this invention, and it deals is said, and although these active substance is little, it is matter, such as a polypeptide of varieties in which it is compounded and deals at once, and an oligonucleotide.

[0019]

[Example] Hereafter, an example explains this invention further.

(Example) On the glass slide glass of the manufacture 1cmx1cm magnitude of the reactant chip accompanied by composition of 1. probe That in which the spot of 10,000 (100x100) individual was formed is used as a substrate. Four kinds of nozzles which have the discharge opening of 1000 (100x25) individual are prepared. The equipment which a reagent storage tank is prepared through a supply way, and has piezo-electricity / electrostriction component was prepared so that A, G, C, and T to which the protective group was attached to each could be supplied, and A, G, C, and T were spotted in sequence as shown in drawing 1 . First, the cartridge containing A raw material was moved and A raw material was supplied to the predetermined spot. Next, the cartridge containing A raw material moved to the following substrate, and supplied the predetermined spot similarly. Next, the cartridge containing G raw material carried out the spot of the G raw material to the location of a degree. Henceforth, the cartridge containing T raw material and C raw material moved in order, and carried out the spot. After the primary salt radical was compounded, much reactant chips with which the oligonucleotide of 18 \*\*\*\* which repeated this the actuation of a series of 18 times, and were compounded was recorded by fixed regularity were obtained. Thereby, by the approach using photolithography, that they were ten manufacture 1 lot numbers could perform manufacture of several 100 or more \*\*\*\*\*'s promptly, and the fertilization of a chip of it was attained. In addition, about general synthetic conditions, conditions given in the reference which indicated previously were followed including attachment and detachment of a protective group etc.

[0020] 2. The solution which contains an enzyme in the same substrate as the example above 1 of manufacture of the reactant chip which used the enzyme in the sample storage tank of the nozzle equipment for regurgitation was contained. The regurgitation nozzle was operated and each spot was made to support the solution containing an enzyme so that each solution may not contact other solutions. Subsequently, the solvent was evaporated from the solution currently supported by the spot and the reactant chip of this invention with which only the enzyme was supported by the spot was obtained. Thereby, the reactant chip with which the dot of 10,000 enzymes was independently supported on the substrate of abbreviation 1cmx1cm magnitude was obtained. Regurgitation actuation was ended, without it taking several minutes, and whole working hours were very efficient slightly in about 1 hour.

[0021]

[Effect of the Invention] According to this invention, the reactant chip which accumulated the active substance, such as a DNA fragment, on the front face can be offered easily, without requiring a special facility of a photolithography facility etc. Though minimized from the physical constraint on a manufacturing technology like the spotting approach, since it is limited, moreover, the diameter for a point of a spotting member 1 time of the amount of spotting of min is as large as 1nl, and there are very few 1 time of amounts of spotting as 5-20pl which is 1/200 to about 1/50 to the spot of the same number, without having to use expensive, various probes for a large quantity inevitably. Even if this point

compares with the spotting approach, it is clear that it is economical for whether your being Haruka. In addition, even if it puts in the drying time of a solvent for the time amount required for manufacturing the reactant chip which has 10,000 spots, slightly, it is about 1 hour and is clear in a very efficient thing.

---

[Translation done.]

## \* NOTICES \*

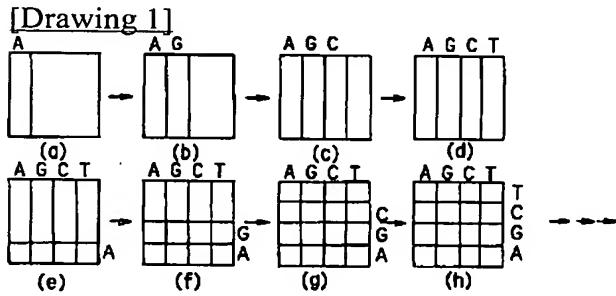
**JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.**

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

DRAWINGS

---



---

[Translation done.]